

ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DEL MÚSCULO *GLUTEUS MEDIUS* DEL CABALLO DE TIRO MESTIZO CHILENO, SOMETIDO A TRABAJO DE LABRANZA POSTERIOR A UN PERÍODO PROLONGADO DE INACTIVIDAD

Ultrastructural Analysis of Muscle *Gluteus Medius* of Chilean Crossbred Horse Submitted to Agricultural Labor After a Long Time Rest

Luis Eduardo Sucre P.¹, Héctor José Finol², Rubén Pérez F.³ e Italo Pacheco¹

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Apartado 4563. Maracay, estado Aragua, Venezuela.

²Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Apdo. 47114. Caracas 1041, Venezuela.

³Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Concepción Av. V. Méndez 595. Chillán, Chile

RESUMEN

El caballo mestizo de tiro chileno es un animal que ha sido seleccionado para realizar trabajos de fuerza y resistencia, con el fin de que presente una aptitud física adecuada a las funciones que debe desarrollar durante las diversas labores agrícolas. A pesar de la importante contribución que aporta a las economías agrícolas de los países en vías de desarrollo, poco se conoce aún acerca de su adaptación muscular al trabajo de tracción. Generalmente, estos animales son sometidos a trabajos intensivos después de largos períodos de descanso y a diferencia de los caballos de deporte, no existe preocupación acerca de la aptitud física y, preparación que deberían tener previo al inicio de la temporada de trabajo. El presente estudio tuvo por objetivo analizar los principales cambios ultraestructurales que se observan en el músculo glúteo medio de los caballos mestizos de tiro chileno, durante la actividad de labranza al inicio de la temporada de trabajo agrícola, después de un largo período de reposo. Para tal fin, se hicieron biopsias por punción percutánea al Músculo *gluteus medius*, de 4 caballos machos de tiro, mestizo chilenos, de edades comprendidas entre 10 y 12 años, e inactivos por un período de 3 meses. Las muestras del músculo esquelético, fueron obtenidas antes y después de una actividad de aradura rutinaria y, se procesaron para microscopía electrónica de transmisión, según técnicas convencionales de corte fino. Los análisis ultraestructurales de las micrografías electrónicas de los especímenes del

músculo esquelético de los animales estudiados después de la actividad física, mostraron los siguientes cambios subletales: alteraciones en el sistema contráctil (disminución del número de los miofilamentos), cambios en la densidad electrónica de las mitocondrias (mitocondrias edematizadas), presencia frecuente de estructuras lisosomales (principalmente gránulos de llipofucsina), engrosamiento de la membrana basal de los capilares intramusculares y oclusión parcial de los mismos por la presencia de prolongaciones hacia la luz del capilar y presencia de macrófagos. Tales resultados sugieren la posibilidad de que exista una relación directa entre el ejercicio físico desacostumbrado y la respuesta del músculo esquelético a dicha actividad física.

Palabras clave: Caballo de tiro mestizo chileno, labor agrícola, músculo esquelético, cambios ultraestructurales.

ABSTRACT

Chilean draught crossbred horse is a animal that was selected to make heavy and resistance draught work, whit the purpose of obtaining a physical aptitude to adapted to functions horse that debit developed during different agricultural tasks. Despite the important contribution of these animals in the agricultural economies of many countries in process of development, little is know about the muscular adaptation to draught work. Generally, these animals are subjected to intensive work after a period of rest, and contrary to sport horses, there is not preoccupation about the physical aptitude and preparation they should

have after the beginning of season of work. The aim of this study was to analyze the main ultraestructural changes present in the *Muscle gluteus medius* of chilean draught crossbred horses subjected to agricultural work after a long period of repose. For this, biopsies by percutaneous puncture were performed from the *M. gluteus medius* of 4 males of Chileans draught crossbred horses 10-12 years old inactive during 3 month. Specimens samples were taken before and after routine agricultural work and processed for conventional electron techniques. The ultraestructural analysis of electron micrographs of skeletal muscle in physical active animals, showed swollen mitochondria, abundance of lysosomal structures, increased of thickness basement membrane of intramuscular capillaries and its partial occlusion by the presence of surface infolding into the lumen, and the macrophages. These results suggest to possible existence of a direct relationship between disaccustomed physical exercise and response of skeletal muscle to this physical activity.

Key words: Chilean draught crossbred horse, agricultural labours, skeletal muscle, ultraestructural changes.

INTRODUCCIÓN

La tracción animal ha sido por tradición un recurso energético nativo importante en la agricultura chilena, particularmente entre los pequeños y medianos agricultores quienes necesitan fuentes baratas y prácticas de energía, y costos apropiados al tamaño de sus predios [30, 54]. De los animales disponibles, el caballo es la especie mejor adaptada para realizar trabajo de tracción [54]. Dentro de esta especie, son las razas de tiro las que presentan una constitución anatómica y fisiológica adecuada para realizar una actividad muscular prolongada y a mayor velocidad que los bovinos [54, 55]. Desde este punto de vista, el caballo está considerado como el animal de tiro más eficiente, con mayor capacidad de tracción y resistencia al trabajo muscular continuo [55]. A pesar de la importante contribución que ellos realizan a las economías agrícolas de los países en vías de desarrollo, poco se conoce aún acerca de su adaptación muscular al trabajo de tracción. Por lo general, estos animales son sometidos a trabajos intensivos después de largos períodos de descanso y a diferencia de los caballos de deporte, no existe preocupación acerca de la aptitud física y preparación que debieran tener antes del inicio de la temporada de trabajo.

Esta falta de acondicionamiento físico previo a las actividades rutinarias de labranza, podría generar cambios en la homeostasis de las fibras musculares esqueléticas que se traduciría en atrofia o en necrosis segmental, dependiendo de la intensidad y duración del trabajo al cual sean sometidas las masas musculares [21]. Lamentablemente, esta respuesta primordial del músculo ante la agresión conocida, de forma genérica como rabiomólisis [39], es la misma que se observa en los cuadros histopatológicos de diversas etiologías [27], por lo que el análisis diferencial en cuanto al agente etiológico, tiene

poco valor diagnóstico [39]. Sin embargo, el estudio de las alteraciones estructurales que en ocasiones pudieran ocurrir en la musculatura esquelética por efecto de cualquier noxa, podría tener importancia no solo diagnóstica, sino además, preventiva.

Es importante señalar, que el ejercicio físico se encuentra dentro de las causas más frecuente que inciden en la disminución del rendimiento en los equinos [40]. Las razas de caballos de tiro son las más proclives a esta disminución ya que sus masas musculares son sometidas en forma periódica a trabajos de larga duración e intensidad [60]. En este contexto, con el presente trabajo, se intentó dilucidar las alteraciones que tienen lugar en la musculatura esquelética en la raza de caballos mestizos de tiro chileno, empleando para ello el análisis ultraestructural.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Para la realización del presente estudio, se realizaron biopsias musculares por punción percutánea a cuatro (4) caballos mestizos chilenos de tiro machos, de edades comprendidas entre 10 y 12 años. Todos los caballos al momento de la biopsia se encontraban en estado de reposo, por 90 días (época de invierno). Durante este período de tiempo fueron alimentados con los mismos componentes de la dieta que habitualmente se les suministra sobre la base de pradera natural mejorada y suplementada con heno de trébol.

Para el momento de la biopsia se encontraban en buenas condiciones físicas (clínicamente sanos), la conformación de los mismos era comparable y el peso corporal fluctuó entre 500 a 550 k aproximadamente. Estos animales presentaban todas las características hipométricas descritas para el caballo de tiro mestizo chileno por Pérez y col. [55].

Para la toma de los especímenes de biopsia muscular del Músculo *Gluteus medius* de los caballos de tiro, se siguieron las pautas descritas por Lindholm y Piehl [41]. Se seleccionó el Músculo *gluteus medius* para la toma de biopsias porque experiencias anteriores señalan que la región de la grupa no involucra riesgos tanto para la práctica de inyecciones profundas [56] como para la toma de biopsia [34].

Por otro lado, se consideró además el rol considerablemente importante de la función que tiene este músculo en la propulsión del cuerpo en el espacio durante la locomoción [64], que en ocasiones lo involucra en forma directa en el esfuerzo que se realiza durante la tracción, por lo cual podría ser afectado en la realización de esta actividad.

Descripción de la técnica de biopsia muscular sobre el músculo glúteo

En todos los casos, tanto en reposo como después de una labor agrícola (tres horas de aradura), las biopsias fueron

realizadas permaneciendo los caballos en estación sin tranquilización previa. Para ello, se obtuvieron referencias anatómicas concretas, ejecutándose las biopsias sobre el área que dista 3 cm dorsal al límite entre los tercios craneal y medio de la línea que une el centro de la espina ilíaca ventral, con el punto más culminante de la porción caudal del trocánter mayor del fémur [44]. En la zona seleccionada, se rasuró y asepsizó un área de 5-10 cm². A continuación, se inyectaron subcutáneamente 3 ml de clorhidrato de procaina (Novocaína®, solución al 2%) con una aguja recta de 0,8 mm x 25 mm a lo largo de la línea prevista, que podría afectar la piel y la fascia de revestimiento externo del músculo, pero no al tejido muscular subyacente, pudiendo esto alterar las características de la muestra [67]. Transcurridos entre 3 y 5 minutos de la infiltración anestésica, se procedió a la intervención propiamente dicha. Para ello se incidió (aproximadamente 5 mm) la piel, tejido subcutáneo y fascia glútea con la hojilla de un bisturí N° 4.

De seguida, la aguja de biopsia muscular diseñada por Bergström [5], se insertó en el espesor del músculo con dirección ventromedial y con la ventana de la aguja dirigida hacia arriba o hacia un lado. Todas las muestras se tomaron a una profundidad de 5 cm. Para ello se retiró parcialmente el cilindro interno cortante, al tiempo que la aguja se comprimió con suavidad contra la masa muscular mediante un movimiento de palanca, para favorecer así la entrada del tejido muscular a través de la ventana. En este momento el cilindro interno cortante se introdujo produciéndose con este movimiento la sección de muestra muscular. Esta operación se repitió de 2 a 3 veces, a fin de extraer una cantidad suficiente de tejido muscular (50-200 mg de tejido). Por último, se extrajo la aguja con suavidad del músculo, y la muestra (ya con la aguja fuera del músculo) se sacó del interior del cilindro interno cortante con la ayuda del estilete. Al extraer la aguja se empapó la superficie de la piel con un algodón embebido en alcohol isopropílico, haciendo presión con los dedos índice y pulgar sobre el área con el propósito de hacer hemostasis. La operación no requiere sutura cutánea y concluye con la disposición sobre la herida quirúrgica de sustancias cicatrizantes y antisépticas.

Ultraestructura

Luego de la realización de la biopsia muscular percutánea, las tiras de músculo se procesaron en forma inmediata para su observación al microscopio electrónico de transmisión, siguiendo las pautas para la técnica de corte fino, mediante los pasos siguientes:

Prefijación con glutaraldehído al 3% en buffer fosfato de Millonig (pH 7,4) y a 4°C de temperatura durante 45 minutos. Tres lavados con buffer fosfato (pH 7,4) y a 4°C, un (1) minuto cada lavado. Post-fijación con OsO₄ al 1% en buffer fosfato de Millonig a 4°C durante una (1) hora. Lavado con agua destilada a 4°C durante 15 minutos. Precoloración con 3% acetato de uranilo en agua a 4°C durante 15 minutos. Deshidratación en alcoholes crecientes (50°, 60°, 80°, 95° y 100°), cinco minutos en cada uno (con la excepción del etanol de 50% y 100% don-

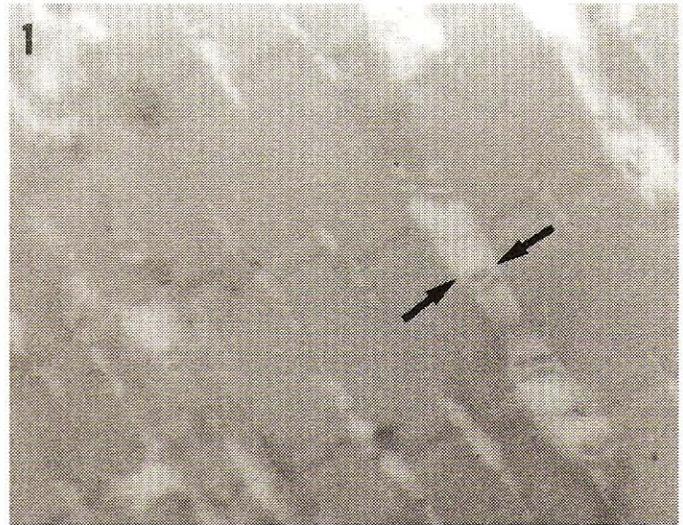


FIGURA 1. SECCIÓN LONGITUDINAL DEL *M. GLUTEUS MEDIUS* DE UN CABALLO MESTIZO DE TIRO CHILENO, POSTERIOR AL TRABAJO DE LABRANZA, DESPUÉS DE UN PERÍODO DE INACTIVIDAD DE TRES (3) MESES. SE HACE EVIDENTE EN ESTA SECCIÓN LONGITUDINAL, UN INCREMENTO CONSPICUO DE LOS ESPACIOS INTERMIOFIBRILARES (FLECHAS). 17.200X.

de las muestras se deshidrataron dos veces (2 cambios) 5 minutos cada uno). La temperatura hasta el alcohol de 80° fue de 4°C, siguiendo la deshidratación a partir de este alcohol a temperatura ambiente. Infiltración en óxido de propileno (2 cambios por 15 minutos cada uno), óxido de propileno-resina epóxica LX-112 (1:1) (por 15 minutos), y en la resina epóxica LX-112 (LADD Res. INC, Burlington) (4 cambios de 30 minutos cada uno). Inclusión en cápsulas de polietileno con la resina epóxica LX-112 durante 48 horas en una estufa a 60°C. Cortes (finos de un espesor de 50 a 90 nm y gruesos de μ m) con una cuchilla de diamante. Coloración con acetato de uranilo al 1% en solución acuosa a temperatura de 45°C por 30 minutos, y citrato de plomo a 25°C por 10 minutos. Observación en un microscopio electrónico de transmisión marca Hitachi modelo H-500, con voltaje de aceleración de 100 kV.

RESULTADOS

El análisis ultraestructural reveló que la respuesta al ejercicio físico desacostumbrado se enmarca dentro de los esquemas generales de la reacción de este tejido especializado, ante la intensidad del efecto de otros agentes etiológicos de rabdomiólisis. En este sentido, se observaron cambios sutiles en las fibras musculares esqueléticas, posteriores a la realización de un ejercicio físico rutinario de tracción, después de un período de inactividad de tres (3) meses.

Ultraestructuralmente se evidenciaron cambios en el sistema contráctil de las fibras musculares afectadas. Tales cambios consistieron en pérdida de miofilamentos aunque con la conservación de la estriación, FIGS. 1, 2, 4. Concomitante-

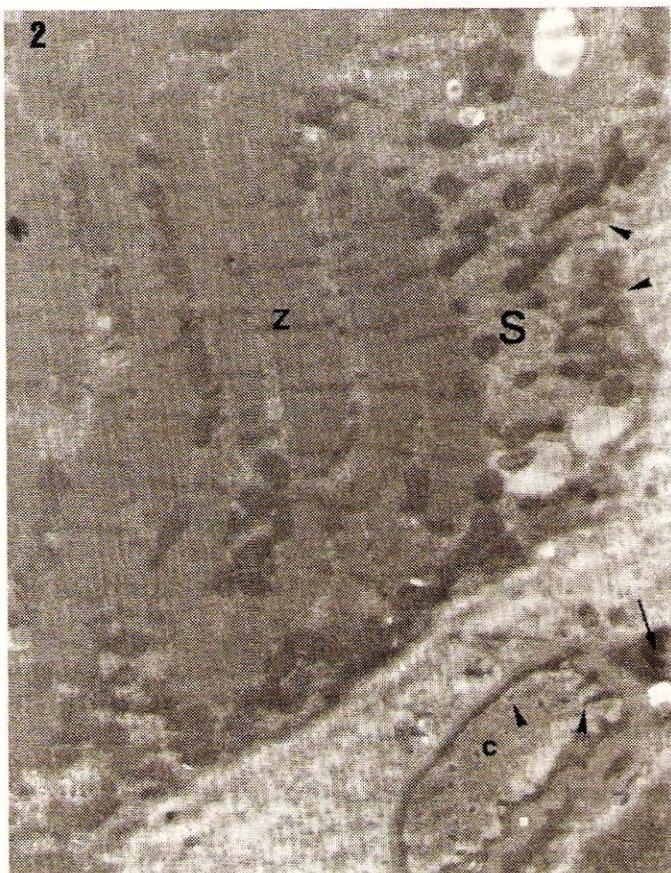


FIGURA 2. EN ESTA MICROGRAFÍA ELECTRÓNICA, CORRESPONDIENTE A UNA SECCIÓN LONGITUDINAL DE UNA FIBRA TIPO IIA, SE PUEDE APRECIAR SOBRE TODO A NIVEL SUBSARCOLÉMICA (S), LA PÉRDIDA DE MATERIAL CONTRÁCTIL. ASÍ MISMO, SE OBSERVAN DIFERENTES GRADOS DE PLEGAMIENTOS POR PARTE DEL SARCOLEMA (CABEZAS DE FLECHA). ADICIONALMENTE, TAMBIÉN SE APRECIA UN ENGROSAMIENTO DE LA LÍNEA Z (Z). A NIVEL DEL CAPILAR INTRAMUSCULAR (C), LA PRESENCIA DE PROLONGACIONES DEL ENDOTELIO HACIA LA LUZ DEL CAPILAR (CABEZAS DE FLECHA), ASÍ COMO LA PRESENCIA DE UNA MEMBRANA BASAL ENGROSADA (□) Y DE UN GRÁNULO DE LIPOFUCSINA (FLECHA) EN LA CÉLULA ENDOTELIAL. 6.840X.

mente con estas alteraciones, la línea Z exhibió en algunas miofibrillas un trazo irregular, así como cierto grado de engrosamiento FIGS. 2, 3, 4

La presencia de estructuras lisosomales fue muy frecuente, aunque fueron más comunes los gránulos de lipofucsina, FIGS. 3 y 5, lisosomas primarios y secundarios, FIG. 5. Con relación a las mitocondrias cabe destacar la presencia en ciertos casos de gránulos en su interior, FIG. 3. Los mionúcleos no mostraron alteraciones en su morfología disponiéndose en las fibras musculares a nivel subsarcolémico. En cuanto a las alteraciones ultraestructurales de los capilares intramusculares, cabe destacar la reduplicación y engrosamiento de la membrana basal, presencia de prolongaciones hacia la luz del capilar, y la oclusión parcial de ésta, FIGS. 2, 6 y 7. Paralelamente a es-

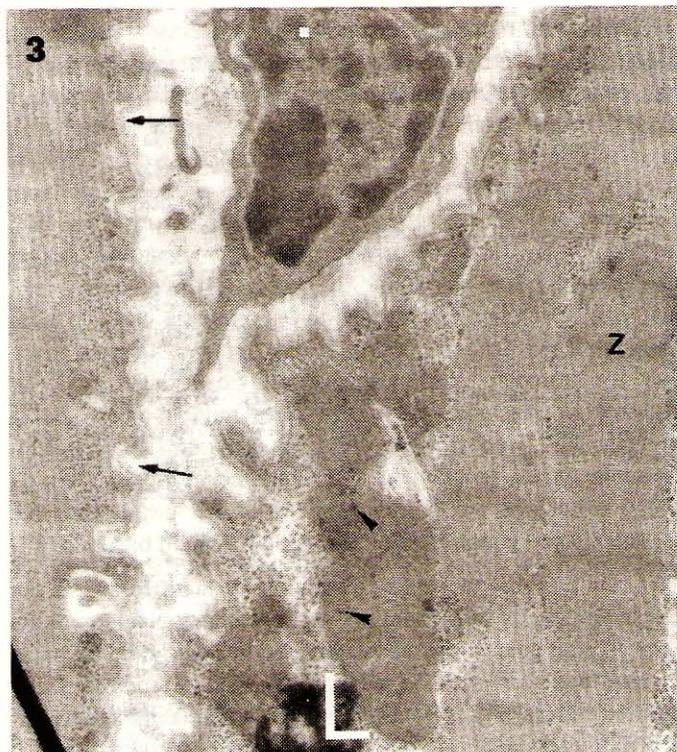


FIGURA 3. EN ESTA MICROGRAFÍA ELECTRÓNICA, SE HACEN EVIDENTES CIERTOS PLEGAMIENTOS DEL SARCOLEMA (FLECHAS), ASÍ COMO EL ENGROSAMIENTO DE LA LÍNEA Z (Z). CON □, SE EXHIBE UN MACRÓFAGO, Y

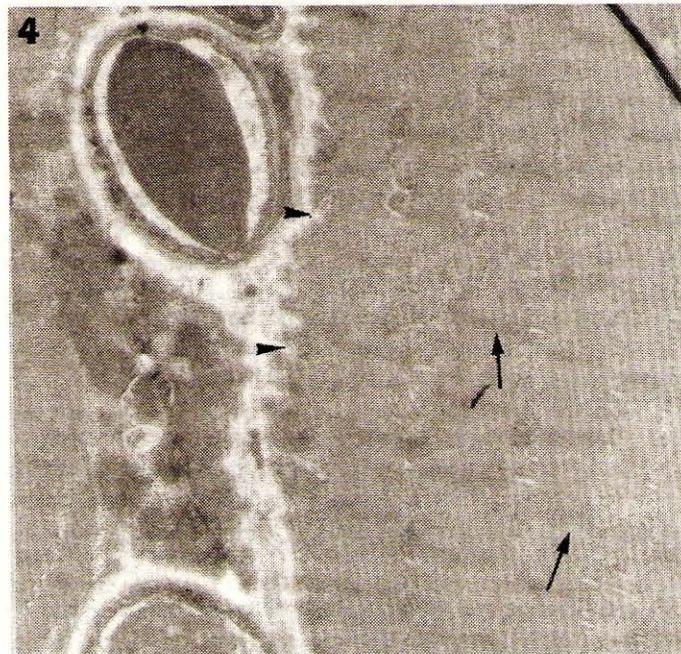


FIGURA 4. EN ESTA SECCIÓN LONGITUDINAL, SE OBSERVA UN MACRÓFAGO □ PRÓXIMO A UN CAPILAR. SON EVIDENTES LOS PLEGUES QUE PRESENTA EL SARCOLEMA (CABEZAS DE FLECHA), ASÍ COMO EL ENGROSAMIENTO DE LAS LÍNEAS Z (FLECHAS). TAMBIÉN SE PUEDE OBSERVAR UNA FIGURA MIELÍNICA (*). AUMENTO: 8.550X.



FIGURA 5. EN ESTA MICROGRAFÍA ELECTRÓNICA, CON UN □ GRÁNULOS DE LIPOFUCSINA, CON UN * UN LISOSOMA PRIMARIO Y CON 2 UN LISOSOMA SECUNDARIO. AUMENTO: 17.200X.

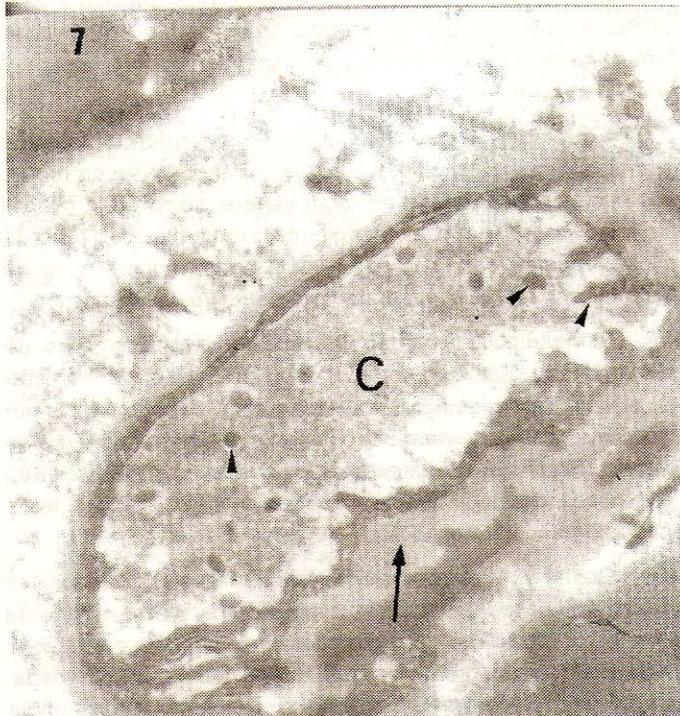


FIGURA 7. EN ESTA MICROGRAFÍA ELECTRÓNICA SE OBSERVA UN CAPILAR INTRAMUSCULAR (C) CON OCLUSIÓN PARCIAL DE LA LUZ. LA MEMBRANA BASAL (FLECHA) SE ENCUENTRA REDUPLICADA. NÓTESE LA PROLONGACIÓN DEL ENDOTELIO HACIA LA LUZ CAPILAR (CABEZAS DE FLECHAS). AUMENTO: 13.760X.

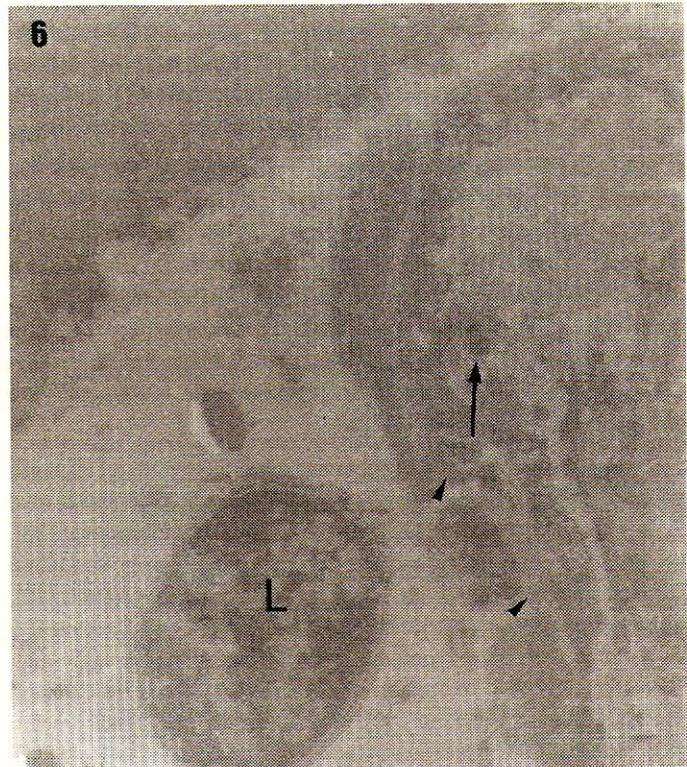


FIGURA 6. EN ESTA MICROGRAFÍA ELECTRÓNICA EL CAPILAR EXHIBE MEMBRANA BASAL (CABEZAS DE FLECHAS) REDUPLICADA Y ENGROSADA, ASÍ COMO PROTRUSIONES HACIA EL LUMEN (FLECHAS). CON L, UN LÍFOCITO. AUMENTO: 13.400X.

tos cambios, el sarcolema experimentó diferentes grados de plegamiento, FIGS. 2, 3 y 4. El infiltrado celular inflamatorio localizado con mayor abundancia en las áreas próximas a los capilares fue macrófagos, FIGS. 3 y 4 y linfocitos, FIG. 6.

DISCUSIÓN

El objetivo primordial de la presente investigación fue analizar, desde el punto de vista ultraestructural, la respuesta del músculo glúteo medio del caballo mestizo chileno de tiro, después de la ejecución de un ejercicio físico rutinario de tracción, ulterior a un período de inactividad de tres (3) meses.

Los hallazgos indican que las alteraciones producidas en el músculo esquelético después de la realización de una actividad física tras un período de inactividad, se componen de cambios ultraestructurales que se podrían enmarcar dentro del concepto de subletales. A pesar de que las alteraciones subletales evidenciadas en la presente investigación, tanto en el músculo esquelético, como en los capilares intramusculares, son inespecíficas (ya que las mismas son comunes a varias enfermedades musculares de diferente etiología), éstas podrían brindar cierta información acerca de los procesos que eventualmente ocurren en el músculo esquelético por efecto de la ejecución de un ejercicio físico desacostumbrado.

Las alteraciones en el sistema contráctil (pérdida de miofilamentos hasta la atrofia y trazado zigzagante de la línea Z), se corresponden con los cambios descritos en la fase subclínica [22] y clínica [42, 67] de la rabdomiólisis por ejercicio.

Procesos similares a los descritos con anterioridad, reportados en trabajos experimentales, serán: el efecto de la isquemia temporal [28, 35], la tenotomía [74], administración de glucocorticoides [58], desnervación [25], combinación de la administración de los glucocorticoides con la desnervación [59], castración [38], el efecto de la administración crónica de Dantrolene sódico [63], de la monensina [71], el efecto de las dietas deficientes de energía [51], y el efecto de la inyección de citoquinas (IL-1, IL-6 y TNF) [26].

Alteraciones semejantes en el sistema contráctil también se han descrito en la miositis reumatoidea [18], en el Lupus Eritematoso Sistémico [17], en la miopatía centronuclear [53], en las miopatías necrotizantes como en la Polimiositis [10] la Dermatomiositis infantil [4, 10] y la Distrofia de Duchenne [19]; en las miopatías metabólicas como deficiencia de Vitamina E y de Selenio [23], en la hipofosfatemia [50]; en deficiencia de maltasa ácida [32], en miopatías endocrinas Síndrome de Cushing [3], miopatías tirotóxicas [19], en la atrofia por desnervación [33], en la atrofia por desnervación con miopatía fibrótica [73], en la enfermedad de Marek en las aves [46], en la miopatía asociada con la acumulación anormal de polisacáridos [72] durante el fenómeno paraneoplásico por Histiocitoma fibroso maligno [16], cáncer broncogénico [70], cáncer del cervix [15], en la rabdomiólisis idiopática en niños [24] y en adultos [62], y en las enfermedades neuromusculares como la atrofia muscular espinal y en la esclerosis amiotrófica lateral [68]; en la enfermedad de Werding-Hoffman [19]; miastemia gravis [76].

La disminución del diámetro de las fibras musculares se ha relacionado con el envejecimiento [6, 8], con el desentrenamiento [43]. Con relación a esto, Fridén y Lieber [21] han sugerido que la sarcómera muscular tiene un umbral físico al daño, el cual disminuye por efecto de la atrofia existente. Enmarcado en estas ideas, la población de equinos analizada en la presente investigación animales viejos (10-12 años) e inactivos (90 días de inactividad), lo que podría tener alguna conexión con las lesiones sarcoméricas observadas en estos animales.

De los cambios a nivel mitocondrial, el hallazgo de los gránulos intramitocondriales concuerda con descripciones similares en miopatías inducidas por el ejercicio físico en caballos trotones, Standardbred [42] y pura sangre de carrera, Thoroughbred [31, 67]. También se ha descrito la presencia de tales gránulos en las miopatías inducidas por la isquemia en el músculo cardíaco [35] y en el músculo esquelético [28], por la crotoxina [65] y por la deficiencia de vitamina E y de selenio [23]. De igual modo, los gránulos intramitocondriales, han sido descritos en la distrofia con degeneración y calcificación de los cardiocitos en el hámster [7].

La presencia de los gránulos intramitocondriales ha sido asociada a disfunciones en los canales de calcio [14]. El resul-

tado neto de este evento es un progresivo incremento de la concentración de calcio dentro del mioplasma, así como dentro de las mitocondrias. Estas últimas tratan de mantener con la introducción de calcio en su interior la homeostasis del calcio intramiocelular [31]. Una de las repercusiones de la alteración de la homeostasis del calcio a nivel intramiocelular es la activación de proteasas calcio dependientes (μ -calpina y m-calpina) que podrían dañar los organelos intramiocelulares y provocar también la degradación de los miofilamentos [66].

La presencia frecuente de gránulos de lipofucsina en las muestras de especímenes de biopsias musculares, tomadas antes y después de la ejecución de un ejercicio físico rutinario de tracción, concuerda con lo señalado por otros autores quienes han aseverado que, la acumulación de tales gránulos en las fibras musculares esqueléticas, está en íntima relación con la edad pigmentos de la edad [13, 19, 77] y con la realización de un esfuerzo físico por parte de los animales jóvenes [67].

Los gránulos de lipofucsina están compuestos de detritus celulares que son resistentes al catabolismo celular [77], por lo que se acumulan inevitablemente como productos de deshechos del metabolismo celular normal [19]. También se ha señalado que la presencia de estos gránulos, es producto de la actividad física [13] y del daño celular [11]. Así mismo se ha reportado que dichos gránulos constituyen la acumulación de productos de la lipoperoxidación de las membranas lipídicas inducida por los radicales libres [77]. Con relación a esto último, se sostiene que el ejercicio físico podría promover la formación de radicales libres, y por tanto, la lipoperoxidación y el daño muscular [6].

En relación al valor diagnóstico que podrían tener estos gránulos, Finol [19] indicó que por hallarse presente en procesos miodegenerativos de etiología variada como en la miopatía tirotóxica [20, 45], el fenómeno paraneoplásico [70] y la miositis reumatoidea [18], su hallazgo podría considerarse de poca utilidad desde el punto de vista de un valor diagnóstico.

Las alteraciones en el sarcolema (diferentes grados de plegamiento), coinciden con sus descripciones en la membrana plasmática de las fibras musculares en la rabdomiólisis por ejercicio en los humanos [52] y en los caballos pura sangre de carrera [67]. También, tales alteraciones se han reportado en la miopatía experimental con cloroquina [2] y durante el fenómeno paraneoplásico [15].

Dentro de las anomalías observadas en los capilares intramusculares, la reduplicación y el engrosamiento de la membrana basal han sido descritos en enfermedades autoinmunes con un compromiso muscular [19]. De estas enfermedades son dignas de mencionar: las reumatoideas [18], las endocrinas como el Síndrome de Cushing [1], las miopatías tirotóxicas [20], la amiotrofia diabética [48], durante el fenómeno paraneoplásico [15], en las enfermedades colágeno vascular como la Polimiositis [36], la Dermatomiositis [12, 36], el Lupus Eritematoso Sistémico [17] y la Esclerosis Sistémica [19]. Así mismo se reportan las alteraciones señaladas en los capilares intra-

musculares en la esclerosis lateral amiotrófica o atrofia por deservación con un componente autoinmune [9]. Con relación a esta última enfermedad, es necesario hacer notar que en las atrofas musculares neurogénicas puras, las alteraciones señaladas en los capilares no se han reportado [25], así como tampoco se han evidenciado en la neurotomía quirúrgica [49].

La reduplicación y el engrosamiento de la membrana basal se han reportado en el Síndrome parapléjico bovino [50], en la distrofia de Duchenne [19, 36] en la hipertensión experimental inducida por DOCA-sal [29] y en la rabdomiólisis por ejercicio en los caballos pura sangre de carrera [67].

Además del engrosamiento de la membrana basal, la presencia de prolongaciones hacia la luz del capilar, y la parcial oclusión de ésta, constituyen alteraciones también inespecíficas observándose en otros desórdenes, tales como: en la miopatía a distancia por efecto del *Toxoplasma gondii* [69], en la miopatía asociada con la hipertensión inducida por DOCA-sal [29], en la miopatía asociada con la deficiencia de fósforo [50], en la dermatomiositis [12], en la polimiositis [37] y en la rabdomiólisis por ejercicio [67].

Cabe destacar que la aparición de gránulos de lipofucsina en el citoplasma endotelial, constituye un hallazgo de poco valor diagnóstico [19], ya que la presencia de estas estructuras lisosomales, y de otros tipos de lisosomas, se han sido identificados en el endotelio capilar en casos de dermatomiositis infantil, polimiositis y Lupus Eritematoso Sistémico [47, 57] y, en la rabdomiólisis por ejercicio [67].

En cuanto al tipo de infiltrado evidenciado en los especímenes de muestras de músculo esquelético, tomadas después de la realización de la actividad física, el mismo consistió fundamentalmente de macrófagos y linfocitos. Tales hallazgos coinciden con otros similares descritos en la castración experimental [38], en la hipertensión experimental inducida con DOCA-sal [29], en la miotoxicosis inducida con monensina [71], en la miopatía experimental por trituración [61], y en la miopatía experimental inducida con EACA Epsilon Ácido Amino Caprónico [10]. También se ha reportado la presencia de macrófagos y linfocitos en las miopatías metabólicas por deficiencia de vitamina E y de selenio [23], en la rabdomiólisis por ejercicio en el hombre [75] y en los equinos [42, 67], así como también en la enfermedad de Marek en las aves [46].

Se estima que las condiciones de trabajo en las cuales los caballos realizaron la labor de labranza, son similares a las descritas en un estudio previo por Pérez y col. [54], donde los animales desarrollaron una fuerza de tracción de 905 N (Newton), a una velocidad promedio de 0,93 m/s. Los resultados de las mediciones de variables fisiológicas y bioquímicas sanguíneas de los animales considerados en dicho estudio, demostraron, como era de esperarse que en los animales sometidos a trabajo muscular de tipo submáximo, se observaran aumentos significativos en los valores de actividad de las enzimas CK

y AST, enzimas que son marcadoras del daño de las células musculares. Pudiendo concluir que los incrementos en las concentraciones séricas de tales enzimas, podrían tener relación con las alteraciones analizadas en las fibras musculares esqueléticas presentes en este estudio y los incrementos en los niveles séricos de las enzimas marcadoras del daño muscular reportados en estudios previos, podrían estar en íntima relación con el proceso de adaptación del músculo esquelético, posterior a un período prolongado de inactividad.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los cambios ultraestructurales más notables observados en las micrografías electrónicas tomadas a los especímenes de muestras de músculo esquelético de los caballos mestizo de tiro chileno, obtenidas después de la realización de una actividad rutinaria de labranza, posterior a un período de inactividad de tres (3) meses, son similares a los descritos en otras patologías musculares de etiología diferente con características subletales.

Los cambios ultraestructurales ocurridos y descritos en la presente investigación en el músculo esquelético de los caballos mestizos de tiro chilenos, posterior a una labor de tracción rutinaria, luego de un período de inactividad, están relacionados con la respuesta del músculo esquelético a la ejecución de un ejercicio físico desacostumbrado.

Las alteraciones subletales observadas en el músculo esquelético en las muestras obtenidas después de la actividad física rutinaria de tracción, permiten sugerir que se hace necesario un acondicionamiento físico previo de estos animales, antes de reanudar las labores agrícolas rutinarias, posterior a un período de inactividad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AFIFI, A.K.; BERGMAN, R.A. Steroid myopathy. A study evolution of the muscle lesion in rabbits. **Johns Hopkins Med. J.** 124: 66-86. 1968.
- [2] AGUAYO, A.J.; HUDGSON, P. Observations on the short-term effects of chloroquine on skeletal muscle. An experimental study in the rabbit. **J. Neurol. Sci.** 11: 301-325. 1970.
- [3] ATSUMI, T.; ISHIKAWA, S.; MIYATAKE, T.; YOSHIDA, M. Myopathy and primary aldosteronism: Electron microscopic study. **Neurology.** 29: 1348-1353. 1979.
- [4] BANKER, B.Q. Dermatomyositis of childhood: Ultrastructural alterations of muscle and intramuscular blood vessels. **J. Pathol.** 138: 129-143. 1975.
- [5] BERGSTRÖM, J. Muscle electrolytes in man: determined by neutron activation analysis on needle biopsy specimens: a study in normal subjects kidney patients

- and patients with chronic diarrhoea. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.** 14 Suppl. 68: 1-110. 1962.
- [6] BROWN, S.J.; CHILD, R. B.; DAY, S. H.; DONNELLY, A. E. Indices of skeletal muscle damage and connective tissue breakdown following eccentric muscle contractions. **Eur. J. Appl. Physiol.** 75: 369-374. 1997.
- [7] BURBACH, J.A. Ultrastructure of cardiocyte degeneration and myocardial calcification in the dystrophic hamster. **Am. J. Anat.** 179: 291-307. 1987.
- [8] CARMELLI, E.; REZNICK, A.Z. The physiology and biochemistry of skeletal muscle atrophy as a function of age. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 206: 103-113. 1994.
- [9] CARPENTER, S. G.; KARPATI, G. Necrosis of capillaries in denervation atrophies in human skeletal muscle. **Muscle Nerve.** 5: 250-254. 1982.
- [10] CULLEN, M.J.; FULTHORPE, J.J., Phagocytosis in the A band following Z line, and I band loss its significance in skeletal muscle breakdown. **J. Pathol.** 138: 129-143. 1982.
- [11] DALEFIED, R.R.; PALMER, D. N.; JOLLY, R.D. Lipofuscin and abnormalities in colloid in the equine thyroid gland in relation to age. **J. Comp. Path.** 111: 389-399. 1994.
- [12] DE VISSER, M.; EMSLIE-SMITH, A.M.; ENGEL, A.G. Early ultrastructural alterations in adult dermatomyositis. Capillary abnormalities precede other structural changes in muscle. **J. Neurol. Sci.** 94: 181-192. 1989.
- [13] DOLMAN, C.L.; MACLEOD, P.M. Lipofuscin and its relation to ageing. In: **Advances in Cellular Neurobiology.** S. Federoff, and L. Hertz (eds.) Academic Press New York. Vol 2: 205-247. 1981.
- [14] DUAN, C.; DELP, M.D.; HAYES, D.A.; DELP, P.D.; ARMSTRONG, R.P. Skeletal muscle Ca²⁺ overload and injury from eccentric exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.** 21: S80. 1989.
- [15] FINOL, H.J.; TONINO, P.; MÁRQUEZ, A.; CORREA, M.; MÜLLER, B.; SOSA, L. Microvascular pathology in the skeletal muscle paraneoplastic phenomenon. **J. Submicroscopic Cytol. Pathol.** 29: 329-331. 1997.
- [16] FINOL, H.J.; MÁRQUEZ, A.; BELLO, B.; RIVERA, H. Ultrastructure of skeletal muscle alterations surrounding a malignant fibrous histiocytoma. **J. Exp. Clin. Cancer Res.** 13: 381-384. 1994.
- [17] FINOL, H.J.; MONTAGNANI, S.; MÁRQUEZ, A.; MONTES DE OCA, I.; MÜLLER, B. Ultrastructural pathology of skeletal muscle in systemic lupus erythematosus. **J. Rheumatol.** 17: 210-219. 1990.
- [18] FINOL, H.J.; MÜLLER, B.; I., MONTES DE OCA; MÁRQUEZ, A. Ultrastructure of skeletal muscle in rheumatoid myositis. **J. Rheumatol.** 15: 552-555. 1988.
- [19] FINOL, H.J. 1986. Contribución al estudio de la ultraestructura del músculo esquelético enfermo. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias. (Trabajo de Ascenso). Caracas, Venezuela. 250 p.
- [20] FINOL, H.J.; MÜLLER, B.; TORRES, S.H.; DOMÍNGUEZ J.; PERDOMO, P.; MONTES DE OCA, I. Ultrastructural abnormalities in muscular vessels of hyperthyroid patients. **Acta Neuropathol.** (Berl.). 71: 64-69. 1986.
- [21] FRIDÉN, J.; LIEBER, R.L. Structural and mechanical basis of exercise-induced muscle injury. **Med. Sci. Sports Exerc.** 24: 521-530. 1992.
- [22] FRIDÉN, J.; SJÖSTRÖM, M.; EKBLÖM B. Skeletal muscle fibre injuries after high-tension anaerobic exercise. **Eur. J. Appl. Physiol.** 57: 360-368. 1988.
- [23] FUJIMOTO, Y.; MADARAME H.; YOSHIDA, H.; MORIGUCHI, R.. Light and electron microscopic studies on muscular degeneration in foals. **Bull Equine Res. Inst.** 23: 14-27. 1986.
- [24] GHATAK, N.R.; ERENBERG, G.; HIRANO, A.; GOLDEN, G.S. Idiopathic rhabdomyolysis in children. **J. Neurol. Sci.** 20: 253-268. 1973.
- [25] GONZÁLEZ-MILO, N.; FINOL, H.J.; MÁRQUEZ, A. Ultrastructural study of reinnervation in a rat fast skeletal muscle. **Acta Cient. Venez.** 39: 257-262. 1988.
- [26] GOODMAN, M.N. Interleukin-6 induces skeletal muscle protein breakdown in rats. **Proc. Soc. Exp. Biol Med.** 250: 182-185. 1994.
- [27] HARRIS, P. Differential diagnosis of an acute episode of a primary myopathy out at pasture. **Equine Vet. Edu.** 8: 272-276. 1996.
- [28] HEFFER, R.R.; BARRON, S.A. The early effects of ischemia upon skeletal muscle mitochondria. **J. Neurol. Sci.** 38: 295-315. 1978.
- [29] HERNÁNDEZ, N.; TORRES, S.H.; FINOL, H.J.; SOSA, A., CIERCO, M. Capillary and muscle fiber type changes in DOCA-salt hypertensive rats. **Anat. Rec.** 246: 208-216. 1996.
- [30] HETZ, E. Mecanización apropiada para el pequeño agricultor. En: **Curso de actualización "Energía animal en la agricultura"**. Universidad de Concepción, Facultad de Medicina Veterinaria. Chillán, Chile. Septiembre 1994.
- [31] HODGSON, D.R. Exercise-associated myopathy: is calcium the culprit. **Equine Vet. J.** 25: 1-3. 1993.
- [32] HOROUPIAN, D.S.; KINI, K.R.; WEISS L.; FOLLMER, R. Selective vacuolar myopathy with atrophy of type II fibres. **Arch. Neurol.** 35: 175-178. 1978.
- [33] HULLAN, T.J. Muscle and tendons. In: **Pathology of Domestic Animals.** J. Kennedy and A.C. Palmer. (ed.). 3th edition., Academic Press New York: 139-199. 1985.

- [34] ISLAS, A.; QUEZADA, M.; MORA, G.; MERINO, V.; MARIN, L.; BRIONES, M.; AEDO, V. Características histoquímicas de las fibras del músculo Gluteus medius en equinos de tiro. **Arch. Med. Vet.** 28: 83-91. 1996.
- [35] JENNINGS, J.C.; HERDSON, P.B.; SUMMER, H.M. Structural and functional abnormalities in mitochondria isolated from ischemic dog myocardium. **Lab. Invest.** 29: 548-557. 1969.
- [36] JERUSALEM, F. Circulatory disorders and pathology of intramuscular blood vessels. In: **Skeletal muscle pathology**. F.L. Mastaglia and Walton, J. (ed.) Churchill, London, Melbourne, New York: 537-560. 1982.
- [37] JERUSALEM, F.; RAKUSA, M.; ENGEL, A.G.; MC, R.D. Morphometric study of muscle microvasculature. **Brain.** 97: 115-122. 1974.
- [38] JIANG, B.; KLUERBERG, K.M. Structural and functional analysis of murine skeletal muscle after castration. **Muscle Nerve.** 12: 67-77. 1989.
- [39] KAKULAS, B.A.; ADAMS, R.D. Special categories of primary muscle disease. En: **Diseases of muscle**. 4th ed., B.A. Kakulas and R.D. Adams. (ed.) Harper and Row Publishers, Philadelphia: 311-668; 772-773. 1985.
- [40] LINDHOLM, A. Pathophysiology of exercise induced diseases of the musculoskeletal system of the equine athlete. In: **Equine Exercise Physiology II**. J. R. Gillespie and N.E. Robinson (ed.) ICEEP. Publications, Davis California: 711-727. 1987.
- [41] LINDHOLM, A.; PIEHL, K. Fibre composition, enzyme activity and concentration of metabolites and electrolytes in muscles of Standardbred horses. **Acta Vet. Scand.** 15: 287-309. 1974.
- [42] LINDHOLM, A.; JÖHANNSSÖN, H.; KJAERSGARD, P. Acute rhabdomyolysis ("Tying-up") in Standardbred horses. A morphological and biochemical study. **Acta Vet. Scand.** 15: 325-339. 1974.
- [43] LÓPEZ-RIVERO, L.J.; RUZ, M.C.; SERRANO, A.L.; GALISTEO, A.M. Efecto del entrenamiento y desentrenamiento sobre el tamaño de los tipos de fibras musculares en diferentes razas de caballos. **Arch. Med. Vet.** 25: 127-136. 1993.
- [44] LÓPEZ-RIVERO, J.L.; MONTERDE, J.G.; MIRO, F.; DIZ, A.; MARTINEZ-GALISTEO, A. 1989. Biopsia muscular con aguja percutánea en el caballo: descripción y aplicaciones. **One** 2^a época. 81: 26-28.
- [45] LLORETA, J.; ROQUER, J.; COROMINAS, J.M.; SERRANO, S. Hyperthyroid myopathy with mitochondria paracrystalline rectangular inclusions. **Ultrastructural Pathol.** 20: 61-65. 1996.
- [46] MARADAME, H.; FUJIMOTO, Y.; MORIGUCHI, R. Ultrastructural studies on muscular atrophy in Marek's disease. I. Denervation atrophy in chicken skeletal muscle. A light and electron microscopic study. **Jpn. J. Vet. Res.** 34: 24-49. 1986.
- [47] MAIR, W.G.P.; TOMÉ, F.M.S. Changes in blood capillaries and interstitial tissue of skeletal muscle. In: **Atlas of ultrastructure of diseased human muscle**. (ed.) Churchill, Livingstone, Edinburgh and London:138-243. 1972.
- [48] MÁRQUEZ, A.; TORRES, S.H.; FINOL, H.J.; FIGUEROA, L.; De Blanco, M.C. Capillary alterations and mononuclear cell infiltrate in a case of diabetic amyotrophy. **Acta Cient. Venez.** 40: 251-252. 1989.
- [49] MÁRQUEZ, A.; FINOL, H.J. Efectos de la neurotomía quirúrgica sobre la ultraestructura de los músculos abdominales humanos. **Acta Cient. Venez.** 34 (supl.1): 23. 1983.
- [50] MEDINA-LÓPEZ, N.; FINOL, H.J.; MARÍN, C. Patología ultraestructural del músculo esquelético en el síndrome parapléjico bovino. **Acta Cient. Venez.** 45: 120-126. 1994.
- [51] METHA, j.; CHOPRA, J.S.; METHA, S.; NAIN, C.K.; BHAGWAT, A.G.; DHAND, U.K.; RANA, S.V. Ultrastructure and activity of some enzymes of energy metabolism of skeletal muscle in experimental energy deficiency. **Ann. Nutr. Metab.** 31: 35-46. 1987.
- [52] O'REILLY, K.P.; WARHOL, M.J.; FIELDING, R.A.; FRONTERA, W. R.; MEREDITH, C. N.; EVANS, W.J. Eccentric exercise-induced muscle damage impairs muscle glycogen repletion. **J. Appl. Physiol.** 63: 252-256. 1987.
- [53] PAGES, M.; CESARI, J.B.; PAGES, A.M. La myopathie centronucléaires. Revue complète de la littérature á propos d'un cas. **Ann. Pathol.** 2: 301-310. 1982.
- [54] PÉREZ, R.; VALENZUELA, S.; MERINO, V.; CABEZAS, I.; GARCÍA, M.; BOU, R.; ORTIZ, P. Energetic requirements and physiological adaptation of draught horses to ploughing work. **Animal Sci.** 63: 343-351. 1996.
- [55] PÉREZ, R.; SOTO, R.; CABEZAS, I.; GARCÍA, M.; ISLAS, A.; BERIOS, A.; CHAVARRIA, C. Descripción de las características hipométricas del caballo mestizo de tiro chileno. **Agro-Ciencia.** 9: 31-42. 1993.
- [56] PÉREZ, L. P.; GUZMAN, R. **Técnica de inyecciones en medicina veterinaria**. Universidad de Chile, Facultad de Medicina Veterinaria. Santiago: 70. 1974.
- [57] RINGEL, S.; FORSTOT, J.; WEHLING, E.; GRIGGS, R.; BUTCHE, D. Sjogrens syndrome and polymyositis or dermatomyositis. **Arch. Neuro.** 39: 157-163. 1982.
- [58] ROBINSON, A.; CLAMANN, P. Effects of glucocorticoids on motor units cat hindlimb muscle. **Muscle Nerve.** 11: 703-713. 1988.

- [59] ROLEAU, G.; KARPATI, G.; CARPENTER, S.; SOZA, M.; PRESCOTT, S.; HOLLAND, P. Glucocorticoid excess induces preferential depletion of myosin in denervated skeletal muscle fibres. **Muscle Nerve**. 10: 428-438. 1987.
- [60] ROSE, R.J.; HODGSON, D.R. **Manual of equine practice**. W.B. Sanders (ed.). Company, Harcourt Brace Jovanovich. Inc. Philadelphia, Pennsylvania: 19106. 1993.
- [61] RUSHTON, J.L.; DAVIES, L.; HORAN, M.A.; MAHON, M.; WILLIAMS, R. Production of consistent crush lesions of murine skeletal muscle in vivo using electromechanical device. **J. Anat.** 190: 417-422. 1997.
- [62] SCARPELLI, D.G.; GRIDER, M.H.; FRAJOLA, W.J. Idiopathic recurrent rhabdomyolysis. A clinical chemical and morphological study. **Am. J. Med.** 34: 426-433. 1963.
- [63] SILVERMAN, A.; HIKIDA, R. S.; STARTON, R.S. Loss of thick filaments from fast-twitch glycolytic muscle fibres of pigeon pectoralis after chronic administration of Dantrolene sodium. **Am. J. Anat.** 155: 69-82. 1979.
- [64] SISSON, S; GROSSMAN, J.D. *Miología de los equinos*, En: **Anatomía de los animales domésticos** (Tomo I). 5ta edición, C.E. Rosenbaum, N.G. Glosail y Y.D. Hillman (ed.). Edi. Salvat Editores, S.A. España: 423-507. 1985.
- [65] SHAH, A.J.; SAHGAL, V.; MUSCHLER, G.; SUBRAMANI, V.; SING, H. Morphogenesis of the mitochondrial alterations in muscle diseases. **J. Neurol. Sci.** 55: 25-37. 1982.
- [66] SOZA, M.; KARPATI, G.; CARPENTER, S.; PRESCOTT, S. Calcium-induced damage of skeletal muscle fibres is markedly reduced by calcium channel blockers. **Acta Neuropathol.** (Berl.). 71: 70-75. 1986.
- [67] SUCRE, L. Rbdomiólisis en el equino: Análisis ultraestructural, histoquímico, biquímico y hematológico. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina. Caracas. (Tesis Doctoral). 470pp. 1991.
- [68] TANG, L.; SWASH, M. Origin and significance of small muscle fibres in neuromuscular disease. **Virchows Arch.** 410: 113-118. 1986.
- [69] TONINO, P.; FINOL, H.J.; MÁRQUEZ, A. Skeletal muscle capillary ultrastructure in *Toxoplasma gondii* parasitized mice. **Acta Cient. Venez.** 44: 349-354. 1993.
- [70] TONINO, P.; FINOL, H.J.; MÁRQUEZ, A.; PRIETO, J. Ultrastructural pathology of skeletal muscle in the paraneoplastic phenomenon. **J. Exp. Clin. Cancer Res.** 10: 283-289. 1991.
- [71] VALENTINE, B.A.; ROUSSELLE, S.D.; SAMS, A.E.; Edwards III, R.B. Denervation atrophy in three horses with fibrotic myopathy. **J. Am. Vet. Asso.** 205: 332-336. 1994.
- [72] VALENTINE, B.A.; CREDILLE, K.M.; LAVOIE, J.P.; FATONE, S.; GUARD, C.; Cummings, J.F.; Cooper, B.J. Severe polysaccharide storage myopathy in Belgian and Percheron draught horses. **Equine Vet. J.** 29: 220-225. 1997.
- [73] VAN VLEET, J.F.; FERRANS, V.J. Ultrastructural alterations in skeletal muscle of pigs with acute monensine myotoxicosis. **Am. J. Pathol.** 114: 461-471. 1984.
- [74] VELASCO, E.; FINOL, H.J. The effects of tenotomy on the ultrastructure of rat fast twitch muscle. **Acta Cient. Venez.** 34: 124-131. 1983.
- [75] WARHOL, M.J.; SIEGEL, A.J.; EVANS, W.J.; SILVERMAN, L.M. Skeletal muscle injury and repair in marathon runners after competition. **Am. J. Pathol.** 118: 331-339. 1985.
- [76] WITT, N.J.; BOLTON, C.F. Neuromuscular disorders and thymoma. **Muscle Nerve**. 11: 398-405. 1988.
- [77] YING, D. Biochemical basis of lipofuscin, ceroid and age pigment-like fluorophores. **Free Radical Biol. Med.** 21: 871-888. 1996.